



# **OSSO DE CHOCO COMO BIOMATERIAL NA MEDICINA DENTÁRIA**

Monografia de Investigação  
Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade do Porto

**Carlos Miguel Silva Sousa Veiga**

**Porto  
2016**



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Monografia de Investigação

Mestrado integrado em Medicina Dentária

# OSSO DE CHOCO COMO BIOMATERIAL NA MEDICINA DENTÁRIA

Carlos Miguel Silva Sousa Veiga

Aluno do 5º ano do Mestrado Integrado da FMDUP

cm\_veiga@hotmail.com

carlosmiguelssveiga@gmail.com

**Orientadora:** Professora Doutora Ana Isabel Pereira Portela  
Professora Auxiliar da FMDUP

**Co-orientador:** Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira  
Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia  
de Materiais e Cerâmicas da Universidade de Aveiro

Porto  
2016

Aos meus pais,

## Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Isabel Pereira Portela, agradeço pela disponibilidade e dedicação demonstradas. Pelo seu contributo, ajuda, sugestões, ideias e pelo contínuo estímulo para fazer investigação, mesmo nos momentos de maior adversidade.

Ao Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira por fornecer as amostras utilizadas nesta Monografia, bem como pelos seus conhecimentos, apoio e acompanhamento no decorrer de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Augusto Gomes de Oliveira Azenha teço um especial agradecimento por ter disponibilizado os equipamentos do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, bem como pela ajuda na manipulação dos meios técnicos.

Ao Professor Doutor José António Ferreira Lobo Pereira pelo auxílio no tratamento estatístico bem como na interpretação dos resultados.

À minha irmã pela amizade e apoio, por me acompanhar em todas as etapas.

À Catarina, por todo o apoio, cumplicidade, companheirismo e pelo amor incondicional.

Aos meus pais, dirijo o maior agradecimento. Por serem a minha bússola, por me apoiarem em todos os aspetos da minha vida, por sempre me incentivarem a trabalhar para alcançar os meus objetivos e me proporcionarem todos os meios para tal.

## Índice geral

Agradecimentos .....	III
Índice geral.....	IV
Lista de tabelas, figuras e gráficos .....	V
Lista de siglas e abreviaturas.....	VI
Lista de símbolos.....	VII
Resumo .....	1
Abstract.....	3
Introdução.....	5
Objetivo.....	8
Material e métodos.....	10
Redução do osso a pó e processamento HT .....	12
Digestão das amostras .....	13
Análise por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama e por redução a vapores frios de mercúrio.....	14
Análise estatística .....	16
Resultados.....	17
Discussão.....	21
Conclusões .....	34
Referências bibliográficas .....	36
Anexos.....	43
Anexo I - Concentrações de metais pesados no Oceano e limites estabelecidos pela CE.....	44
Anexo II - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Pb .....	45
Anexo III - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Cu .....	46
Anexo IV - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Cd.....	47
Anexo V - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Zn.....	48
Anexo VI - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Hg.....	49
Anexo VII – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras recolhidas no mesmo local A .....	50
Anexo VIII – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras recolhidas no mesmo local B .....	51
Anexo IX – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras sem processamento hidrotermal recolhidas em locais diferentes A e B .....	52
Anexo X – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras com processamento hidrotermal recolhidas em locais diferentes A e B .....	53
Anexo XI - Concentrações limite estabelecidas pela FDA .....	54
Anexo XII – Declaração de autorização da Direção Geral de Alimentação e Veterinária .....	55
Anexo XIII – Declaração de autoria .....	57
Anexo XIV – Parecer da Orientadora .....	58

## Lista de tabelas, figuras e gráficos

Tabela I - Descrição das amostras recolhidas .....	11
Tabela II - média e desvio padrão das concentrações de metais pesados .....	18
Figura 1 - Amostras nos matrizes de Erlenmeyer antes de se adicionar o ácido nítrico .....	13
Figura 2 – Amostras após a adição do ácido nítrico concentrado e após 1h de digestão....	13
Figura 3 – Espectroscopia de absorção atômica por chama .....	15
Figura 4 - Sistema redutor do Hg.....	15
Figura 5 - Esquema representativo de um corte transversal do osso de choco.....	23
Figura 6 - Estrutura porosa lamelar do osso de choco .....	23
Figura 7 - Pormenor da estrutura lamelar do osso de choco .....	23
Figura 8 - Estrutura porosa lamelar do osso de choco após 24h de processamento HT .....	25
Figura 9 - <i>Scaffolds</i> maquinados com várias formatos .....	26
Figura 10 - Viabilidade/proliferação de osteoblastos depois de 72h de incubação.....	27
Figura 11 - Avaliação da viabilidade/proliferação celular da produção de FA após contacto dos osteoblastos com scaffolds sujeitos a 24h de processamento HT .....	28
Gráfico 1 - Comparação das médias de concentrações de Pb.....	18
Gráfico 2 - Comparação das médias de concentrações de Zn.....	19
Gráfico 3 - Comparação das médias de concentrações de Cu.....	19
Gráfico 4 - Comparação das médias de concentrações de Cd.....	20

## Lista de siglas e abreviaturas

<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3</math></b>	Carbonato de amónia
<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4</math></b>	Fosfato de amónia
<b><math>\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2</math></b>	Hidroxiapatite
<b><math>\text{CaCO}_3</math></b>	Carbonato de Cálcio
<b>CB</b>	<i>Cuttlefish Bone</i> (Osso de Choco)
<b>Cd</b>	Cádmio
<b>CE</b>	Comissão Europeia
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b><math>\text{H}_2\text{CO}_3</math></b>	Ácido carbónico
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	Água
<b>HA</b>	Hidroxiapatite
<b>Hg</b>	Mercúrio
<b>HT</b>	Hidrotermal
<b>MTT</b>	Ensaio da redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
<b><math>\text{NaBH}_4</math></b>	Borohidreto de sódio
<b>N.D.</b>	Não disponível
<b>NBT-BCIP</b>	Solução de nitroazul de tetrazólio e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato ou cromogénio da fosfatase alcalina
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pb</b>	Chumbo
<b>SBF</b>	Fluído Corporal Simulado
<b>Zn</b>	Zinco

## Lista de símbolos

<b>°C</b>	grau centígrado
<b>°C/min</b>	grau centígrado por minuto
<b>µg/L</b>	micrograma por litro
<b>µm</b>	micrómetro
<b>g</b>	grama
<b>h</b>	hora
<b>mg</b>	miligrama
<b>mm</b>	milímetro
<b>ng/g</b>	nanogramas por grama
<b>pmol/kg</b>	picomol por quilograma



## Resumo

**Introdução:** O osso de choco é um biomaterial que tem vindo a ser estudado, de forma a ser utilizado em áreas da saúde como a Ortopedia e a Medicina Dentária. Vários testes *in vitro* e *in vivo* têm vindo a ser realizados, bem como outros testes no que toca à citotoxicidade e caracterização biológica e mecânica do material. No entanto, dada a sua origem e antes de se avançar para ensaios em pacientes humanos, este material carece de mais estudos, nomeadamente no que toca à deteção e quantificação de metais pesados presentes na sua composição.

**Objetivos:** Pretendeu detetar-se e quantificar-se os metais pesados presentes no osso de choco antes e depois do processamento hidrotermal, de forma a atestar a sua segurança na implantação no osso alveolar dos pacientes após uma extração dentária e para efeitos de preenchimento de defeitos ósseos.

**Materiais e métodos:** Foram colhidas amostras de osso de choco de exemplares capturados na costa de Esmoriz, em Janeiro e Março do ano de 2016. As recolhas foram feitas em dois mercados municipais distintos. Dividiram-se as amostras em quatro grupos: Grupos A1 e B1 (com material não submetido a tratamento hidrotermal proveniente do Mercado de Santiago no grupo A1 e do Mercado Municipal de Espinho no grupo B1) e Grupos A2 e B2 (com material submetido a um tratamento hidrotermal proveniente do Mercado de Santiago no grupo A2 e do Mercado Municipal de Espinho no grupo B2). As amostras foram reduzidas a pó, digeridas utilizando uma solução de ácido nítrico concentrado (65%) e submetidas à deteção e quantificação de metais pesados através da técnica da espectrometria de absorção atómica por chama (para o zinco, cobre, cádmio e chumbo) e por espectrometria de absorção atómica por redução a vapores frios (para o mercúrio).

**Resultados:** As concentrações médias encontradas nas amostras foram inferiores aos valores máximos estabelecidos pela Comissão Europeia (em relação ao músculo

destinado à ingestão) e às concentrações máximas permitidas estabelecidas pela Food and Drug Administration em todos os metais testados, exceto para o chumbo e cádmio.

**Conclusão:** Em todas as amostras testadas foram detetados os elementos zinco, mercúrio, chumbo, cádmio e cobre. Apesar das concentrações médias de chumbo serem superiores aos valores máximos estabelecidos pela Comissão Europeia e Food and Drug Administration e das concentrações médias de cádmio serem superiores aos valores máximos estabelecidos pela Food and Drug Administration, tal não significa que o material seja excluído de aplicações biomédicas em Medicina Dentária e Ortopedia.

Em trabalhos futuros sugere-se a realização de co-culturas com osteoblastos e osteoclastos, com quantificação de metais pesados presentes no meio de cultura que possam ter sido libertados pela hidroxiapatite obtida por processamento hidrotermal do osso de choco e métodos de processamento do material com vista a diminuir as concentrações de chumbo e cádmio, caso de verifique a sua libertação da amostra para o meio fisiológico.

**Palavras-chave:** osso de choco, preservação da crista óssea, preservação alveolar, regeneração óssea, biomateriais

## Abstract

**Introduction:** Cuttlefish bone has been studied to be used in dentistry and orthopedics. Several *in vitro* and *in vivo* tests have been performed, as well as other tests regarding this material's cytotoxicity, biological and mechanical characterization. However, given the cuttlefish bone's biological origin, more studies are required before the use in human patients, regarding the detection and quantification of heavy metals.

**Purpose:** In this study it was intended to detect and quantify the heavy metals present in cuttlefish bone before and after the hydrothermal processing in order to establish its safety in implantation in the patients' alveolar bone after tooth extraction and bone defects filling purposes.

**Materials and methods:** In January and March of 2016 cuttlefish bones samples were collected from fresh cuttlefish caught in Esmoriz seashore. The samples were purchased in two distinct local markets and divided in four groups: Group A1 and B1 (raw material from Santiago's market in Group A1 and from Espinho's market in Group B1) and Groups A2 and B2 (hydrothermal treated material from Santiago's market in Group A2 and from Espinho's market in Group B2). The samples were reduced to powder, digested with a concentrated nitric acid solution (65%) and then subjected to the detection and quantification of heavy metals by flame atomic absorption technique (for zinc, copper, cadmium and lead) and cold vapor atomic absorption technique (for mercury).

**Results:** The average concentrations found in the samples were below the limits set by the European Commission (for the cuttlefish muscle for human consumption) and the maximum permissible concentrations established by the Food and Drug Administration in all metals tested except for lead and cadmium.

**Conclusions:** In all the samples tested we detected zinc, mercury, lead, cadmium and copper. Despite the average concentrations of lead are higher than the maximum

established by the European Commission and Food and Drugs Administration and average concentrations of cadmium are higher than the maximum levels set by the Food and Drug Administration, that does not mean that the material is excluded from biomedical applications in Dentistry and Orthopedics.

In future studies we suggest conducting co-cultures with osteoblasts and osteoclasts with quantification of heavy metals present in the medium that may have been released by the hydroxyapatite obtained by hydrothermal processing cuttlefish bone, as well material processing methods in order to decrease the concentrations of lead and cadmium, if these metals are, in fact, released by the samples.

**Keywords:** cuttlefish bone, alveolar ridge preservation, socket preservation, bone regeneration, biomaterials.

# Introdução

## Introdução

A extração dentária é um dos procedimentos médico-dentários mais frequentemente realizados e as alterações dimensionais ao nível do rebordo alveolar que ocorrem como consequência deste ato clínico estão bem documentadas na literatura. (1) Foi já demonstrado que a perda óssea horizontal vestibular pode chegar aos 56%, a lingual até 30% (1, 2) e a redução total horizontal do rebordo alveolar pode chegar aos 50%. (1, 3) Tan *et. al.* (4) concluíram que a perda óssea horizontal é maior que a vertical. Estas modificações são importantes no momento de traçar um plano de tratamento de reabilitação protética, tendo em conta as possíveis complicações que serão de esperar durante a reabilitação. (4)

Atualmente, os implantes são amplamente aplicados e tornaram-se presença assídua no dia-a-dia da maior parte dos médicos dentistas. O nível de crista óssea que rodeia o implante é da máxima importância para determinar o sucesso na sua osteointegração, enquanto a preservação da altura de osso marginal é extremamente importante na sua sobrevivência a longo prazo. Várias abordagens têm sido descritas na literatura para prevenir a perda óssea. (5) A perda de altura da crista óssea conduz a uma maior acumulação bacteriana, o que resulta numa peri-implantite secundária, que pode posteriormente levar a uma perda de suporte ósseo, causando um excesso de cargas oclusais no implante que, por sua vez, provocam uma ainda maior perda de crista óssea. (5, 6) Este ciclo vicioso irá, em última instância, causar o insucesso do implante.

Vários estudos (1, 4, 7, 11-16) têm demonstrado que há uma menor reabsorção do rebordo alveolar quando se recorrem a técnicas de preservação comparativamente aos casos onde não se recorre à utilização de nenhum material inserido no alvéolo imediatamente a seguir à extração. Há vários materiais disponíveis no mercado – porém, a maior parte, para além de dispendiosa, é usada na regeneração propriamente dita e não na conservação do alvéolo dentário.

Assim, torna-se pertinente encontrar um material cuja utilização permita não só preservar ao máximo o alvéolo após a extração, mas que também possua baixo custo para que o doente aceite recorrer à sua utilização logo após uma extração dentária e ao

qual o médico dentista generalista possa recorrer na maior parte das extrações dentárias com vista a uma posterior reabilitação do espaço edêntulo.

O osso de choco, também conhecido na literatura como *cuttlebone* ou *cuttlefish bone*, é um material leve, poroso, e que tem merecido considerável atenção na literatura ao longo das últimas décadas. Enquadra-se numa classe de biomateriais ultraleve, de alta rigidez e permeabilidade celular que permite ao choco manter uma flutuabilidade neutra em ambientes de profundidade considerável. (17) Apresenta baixo custo de obtenção, é de origem biológica e está disponível em todo o mundo. (18) Para além destas vantagens, o osso de choco também é compatível com outros tipos de estruturas ósseas e tem uma elevada capacidade osteoindutiva. (19)

# Objetivo



## **Objetivo**

O presente estudo tem como objetivo detetar a presença dos metais pesados zinco, cobre, cádmio, chumbo e mercúrio existentes em amostras de osso de choco pescado ao largo da costa portuguesa.

Foram analisadas diferentes amostras de forma a avaliar se o efeito do processamento hidrotermal a que o material é submetido e o local de recolha das amostras alteram as concentrações detetadas.

Através da deteção e quantificação destes elementos pretendeu-se averiguar se o teor em metais pesados poderá representar um risco na implantação do material no alvéolo dentário imediatamente após a extração dentária em pacientes humanos.

# Material e métodos

## Material e métodos

As amostras usadas neste estudo foram obtidas a partir de chocos frescos pescados ao largo da costa de Esmoriz (Tabela I). A recolha foi feita nos meses de Janeiro e Março de 2016, em dois mercados municipais do distrito de Aveiro. Depois de extraído o osso, este foi limpo com água corrente e seco ao ar.

**Tabela I** - Descrição das amostras recolhidas

Data de receção e proveniência da amostra	Amostra	Não tratada (CaCO <sub>3</sub> )	Transformada (Fosfatos de Cálcio)
<b>Março de 2016</b> <b>Mercado Santiago, Aveiro</b>	1.1	X	
	1.2	X	
	1.3	X	
	1.4	X	
	1.5	X	
	1.6	X	
	1.7		X
	1.8		X
	1.9		X
	1.10		X
<b>Janeiro de 2016</b> <b>Mercado Municipal de Espinho, Aveiro</b>	2.1	X	
	2.2	X	
	2.3	X	
	2.4	X	
	2.5	X	
	2.6	X	
	2.7		X
	2.8		X
	2.9		X
	2.10		X
	2.11		X
	2.12		X

## Redução do osso a pó e processamento HT

Depois de seco, uma parte do osso recolhido foi reduzido a pó, utilizando pilão e almofariz. A outra parte foi hidrotermalmente processada, utilizando um autoclave. Para este processamento HT colocaram-se várias porções de osso de choco num autoclave (feito por encomenda, em aço inoxidável com uma câmara interna em teflon; a tampa externa é fixada com 4 parafusos e a estanquicidade é mantida com um O'ring de Viton). A transformação HT do fez-se com uma velocidade de aquecimento de 5°C/min até aos 200°C, durante 48h de permanência a esta temperatura. Passados os dois dias, o autoclave foi aberto para retirada das amostras. As amostras transformadas foram depois sinterizadas num forno elétrico (Termolab, Portugal), de acordo com o seguinte tratamento térmico: 2°C/min até 500°C, 5°C/min entre 500-1100°C, 1h de patamar a esta temperatura, seguida de arrefecimento natural dentro do forno até uma temperatura próxima da temperatura ambiente. Depois do processamento HT, as amostras foram reduzidas a pó, usando pilão e almofariz.

Quer o processamento HT quer a redução do osso a pó foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmicas da Universidade de Aveiro.

Assim, as amostras foram divididas em quatro grupos:

Grupo A1: Osso sem processamento HT do Mercado de Santiago

Grupo A2: Osso com processamento HT do Mercado de Santiago

Grupo B1: Osso sem processamento HT do Mercado de Espinho

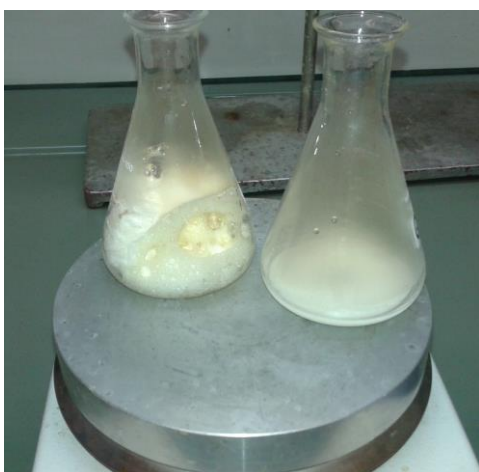
Grupo B2: Osso com processamento HT do Mercado de Espinho

## Digestão das amostras

Com uma balança analítica (Mettler Toledo, modelo AG245, Suíça) pesou-se o conjunto das amostras de cada grupo (A1:  $5.2834 \pm 0.0001$  g; A2:  $4.4426 \pm 0.0001$  g; B1:  $6.6696 \pm 0.0001$  g; B2:  $4.4556 \pm 0.0001$  g). Depois transferiram-se as amostras para os *matrizes de Erlenmeyer* (Figura 1), onde se adicionou o ácido nítrico concentrado a 65%.



**Figura 1** - Amostras nos *matrizes de Erlenmeyer* antes de se adicionar o ácido nítrico concentrado. À esquerda, osso de choco não processado do grupo A1. À direita, osso de choco com tratamento HT do grupo A2.



**Figura 2** - Amostras logo após a adição do ácido nítrico concentrado (esquerda) e após 1h de digestão (direita)

Levaram-se os *matrazes* a uma placa de aquecimento onde se aqueceu a solução até à ebulição (Figura 2). Nos matrazes com as amostras processadas (grupos A2 e B2) observaram-se pequenas partículas de material não digerido mesmo após depois de 2h de digestão, que foram consideradas impurezas, filtradas e descartadas antes da análise por espectrometria.

Após a digestão, em cada um dos *matrazes* adicionou-se água destilada até se obterem 100 mL de solução.

#### Análise por espectrometria de absorção atómica com atomização por chama e por redução a vapores frios de mercúrio

Após a digestão do osso realizou-se à deteção e quantificação dos metais pesados presentes por espectrometria de absorção atómica com atomização por chama para o Zinco (Zn), Cobre (Cu), Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb) utilizando o espectómetro de absorção atómica por chama (Perkin Elmer Instruments, modelo AAnalyst 200, EUA) (Figura 3). Antes da análise de cada um dos metais fez-se a calibração, recorrendo a soluções-padrão de concentração conhecida para cada um dos metais analisados. Fizeram-se 6 leituras para o Pb, Cu e Cd e 3 leituras para o Zn, tendo-se posteriormente calculado a média.

Para se fazer a deteção e quantificação do Hg utilizou-se a técnica de espectrometria de absorção atómica por redução a vapores frios de mercúrio (Perkin Elmer Instruments, MHS-15, EUA), sendo o agente redutor o  $\text{NaBH}_4$  e o gás transportador o argon. Fizeram-se 3 leituras e calculou-se a média.



**Figura 3** – Espectroscopia de absorção atômica por chama



**Figura 4** - Sistema redutor do Hg

## Análise estatística

Para o tratamento estatístico foi utilizado o programa informático SPSS para Windows 10 - IBM SPSS Statistics 23.0 (EUA) e o programa informático Microsoft Office 2013 (EUA). Foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ) para avaliar as diferenças de concentrações entre amostras processadas e não processadas e entre amostras recolhidas em locais diferentes.



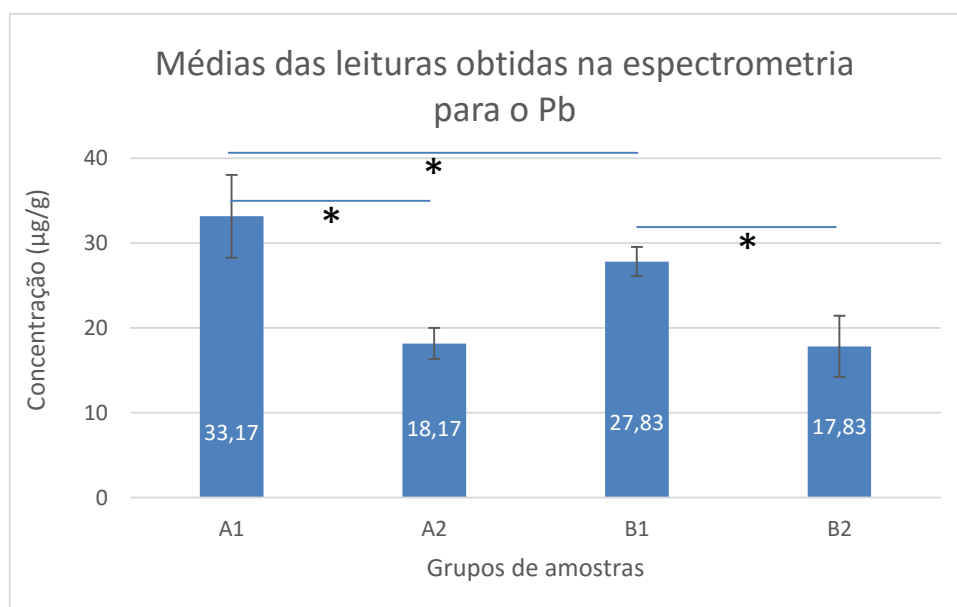
# Resultados

## Resultados

Observando a Tabela II constata-se que em todas as amostras analisadas detetou-se a presença dos elementos pesquisados. No entanto, os valores variaram entre amostras com e sem o tratamento, bem como conforme o local da sua recolha.

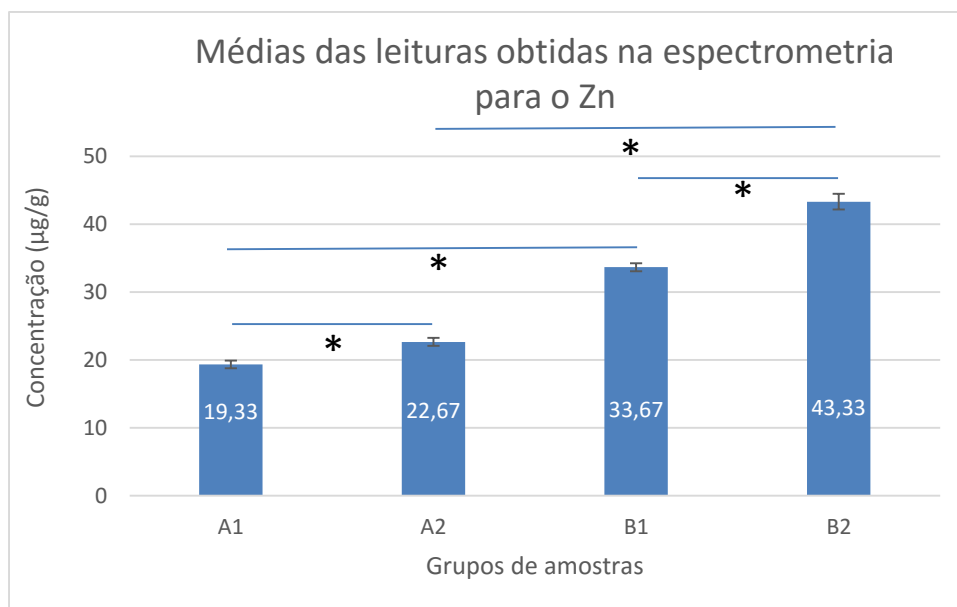
**Tabela II** - média e desvio padrão das concentrações de metais pesados

Metal	A1	A2	B1	B2
<b>Pb (µg/g)</b>	33,17 (4,88)	18,17 (1,83)	27,83 (1,72)	17,83 (3,60)
<b>Zn (µg/g)</b>	19,33 (0,58)	22,67 (0,58)	33,67 (0,58)	43,33 (1,15)
<b>Cu (µg/g)</b>	4,83 (0,16)	5,18 (0,26)	4,00 (0,09)	4,17 (0,08)
<b>Cd (µg/g)</b>	< 0,4 (N.D.)	1,38 (0,30)	< 0,3 (N.D.)	0,75 (0,23)
<b>Hg (ng/g)</b>	< 28 (N.D.)	< 34 (N.D.)	< 22 (N.D.)	< 34 (N.D.)



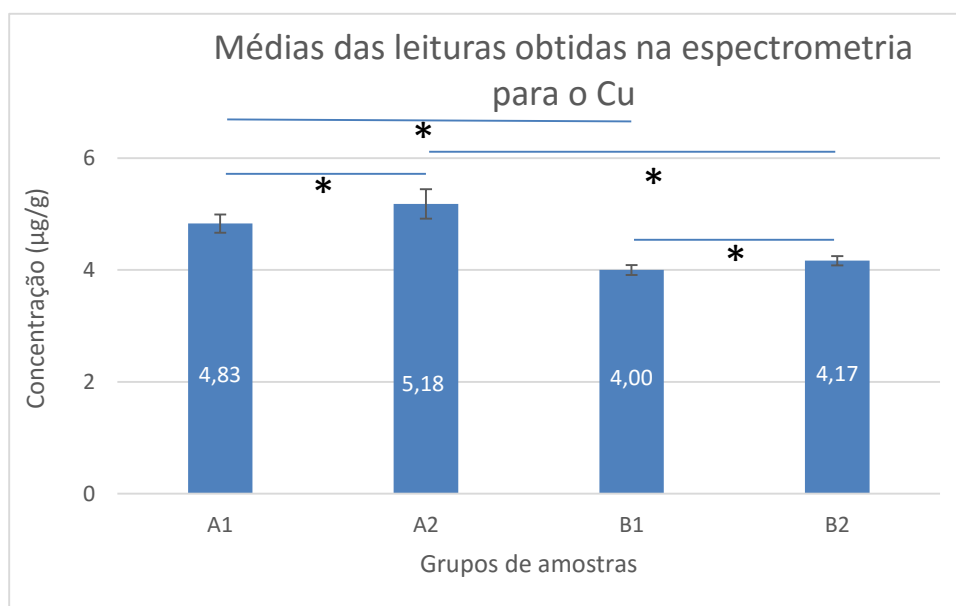
**Gráfico 1** - Comparação das médias de concentrações de Pb. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).

As amostras não tratadas foram as que registaram maiores concentrações de Pb em relação às hidrotermalmente processadas. Das amostras não tratadas, as recolhidas no Mercado de Santiago (A1) registaram a concentração média mais elevada (Tabela II, Gráfico 1).



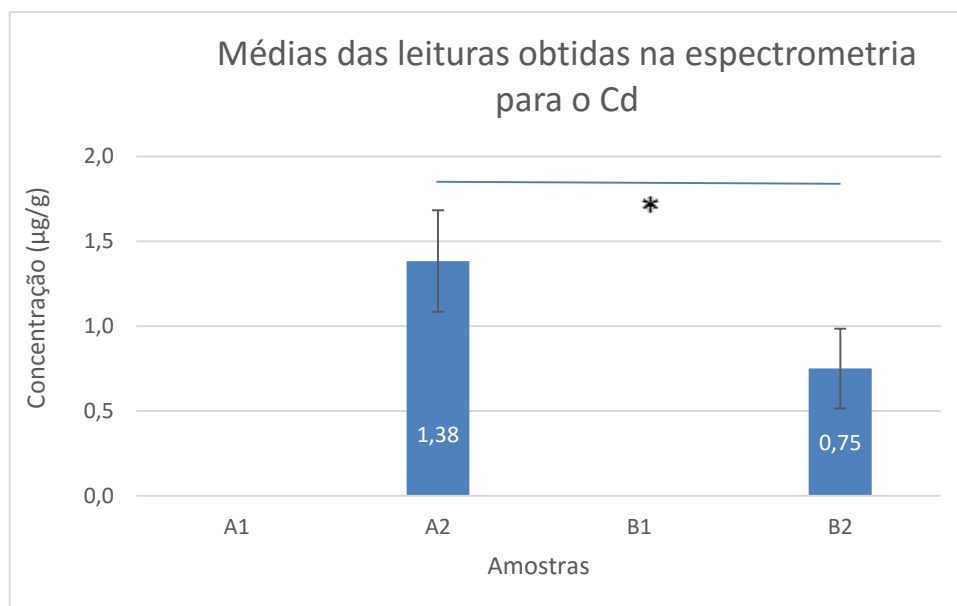
**Gráfico 2** - Comparação das médias de concentrações de Zn. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).

As amostras tratadas registaram concentrações médias de Zn superiores em relação às não processadas. As amostras recolhidas no Mercado de Espinho hidrotermalmente processadas (B2) foram as que registaram uma concentração média superior (Tabela II, Gráfico 2).



**Gráfico 3** - Comparação das médias de concentrações de Cu. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).

As amostras tratadas registaram concentrações médias de Cu superiores às que não foram processadas. As amostras recolhidas no Mercado de Santiago hidrotermalmente processadas (A2) foram as que registaram uma concentração média superior (Tabela II, Gráfico 3).



**Gráfico 4** - Comparação das médias de concentrações de Cd. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores médios de Cd das amostras do grupo A1 e B1 não se encontram representados no Gráfico 4 dado que nas leituras que foram realizadas os valores foram inferiores ao limite de deteção para as massas de amostra utilizadas (foram detetadas concentrações  $<0,4 \mu\text{g/g}$  no grupo A1 e  $<0,3 \mu\text{g/g}$  no grupo B1). As concentrações médias foram superiores nos grupos das amostras hidrotermalmente processadas, sendo as que foram obtidas no Mercado de Santiago (A2) as que registaram uma média superior (Tabela II, Gráfico 4).

No que toca ao Hg, nas leituras realizadas os valores detetados foram inferiores aos limites de deteção para as massas de amostras utilizadas, em todos os grupos de amostras (foram detetadas concentrações  $<28 \text{ ng/g}$  no grupo A1,  $<34 \text{ ng/g}$  nos grupos A2 e B2 e  $<22 \text{ ng/g}$  no grupo B1) (Tabela II).

# Discussão

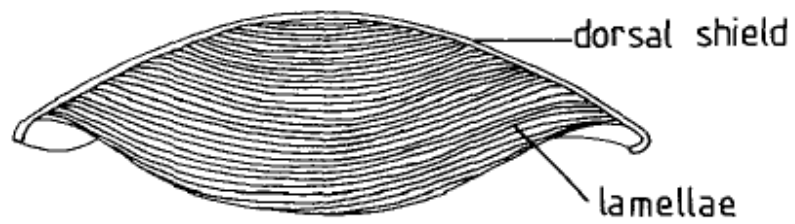
## Discussão

### O osso de choco enquanto biomaterial

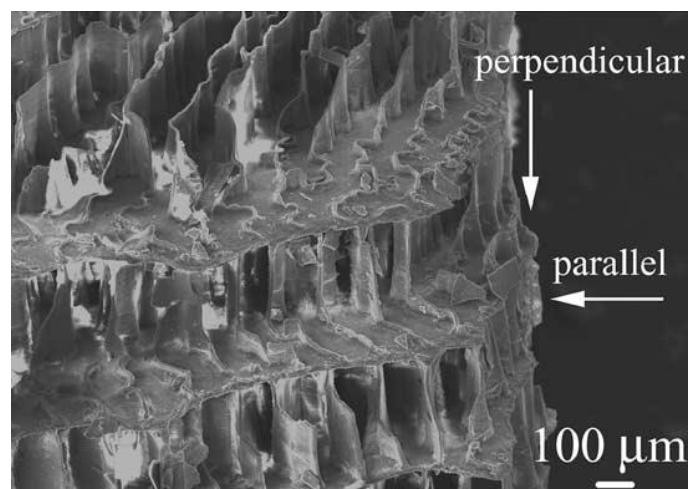
O osso de choco é composto por duas partes: a mais externa – a camada dorsal – é bastante rígida e densa, composta por placas e colunas de aragonite, protegendo a estrutura mais interna – a matriz lamelar – uma estrutura extremamente porosa (podendo chegar até aos 90% de porosidade), com canais que permitem a intercomunicação entre os poros (Figura 5). (17, 18, 20, 21) Segundo Wiesmann *et. al.* (22), os poros de um enxerto ósseo deverão ter um diâmetro entre os 200 e os 500  $\mu\text{m}$  para que possam ocorrer fenómenos de revascularização e reestruturação óssea. Uma vez que o diâmetro dos poros do osso de choco varia entre os 200 e 600  $\mu\text{m}$  (Figuras 6 e 7) (23), é válido colocar a hipótese de que este material poderá ser um enxerto indicado para albergar e manter atividades biológicas tecidulares (24), como crescimento de tecido ósseo e de vascularização. (18) A matriz lamelar é constituída essencialmente por aragonite (18), uma forma cristalizada de carbonato de cálcio (17), envolvida numa camada de matéria orgânica (17, 20, 21) composta essencialmente por uma camada de  $\beta$ -quitina. (17) Esta estrutura porosa possibilita o contacto físico entre os tecidos do hospedeiro e facilita a troca de minerais e a vascularização. (20)

Na Bioengenharia, os *scaffolds* definem-se como biomateriais sólidos e porosos, desenhados para desempenhar várias funções, entre as quais as de promoção de interação entre as células e o biomaterial, adesão, proliferação e diferenciação celular, e a de biodegradação a um ritmo controlado, próximo ao da regeneração tecidular de interesse. (11)

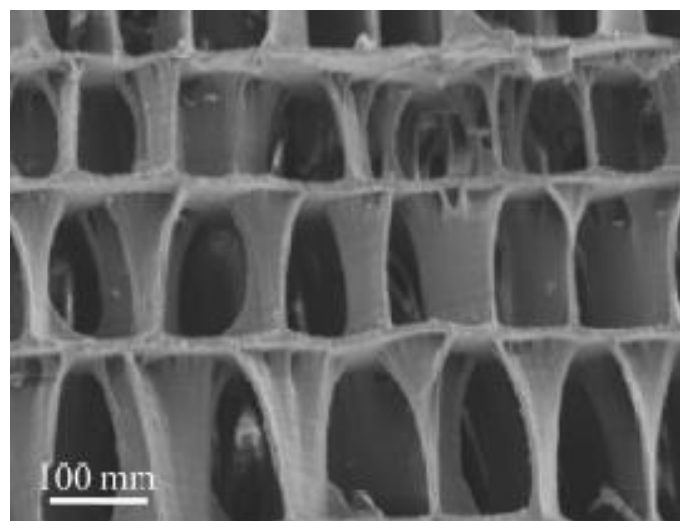
Biominaerais com estruturas complexas como o osso de choco (20) têm sido estudados devido ao seu potencial de aplicações como *scaffolds* na engenharia de regeneração óssea. (25-27) Devido às características químicas, físicas e mecânicas deste material, uma ampla gama de novas aplicações têm sido investigadas. (17)



**Figura 5** - esquema representativo de um corte transversal do osso de choco. Adaptado de (20)



**Figura 6** - Estrutura porosa lamelar do osso de choco. As setas indicam a orientação paralela e perpendicular. Adaptado de (18)



**Figura 7** - Pormenor da estrutura lamelar do osso de choco. Adaptado de (17)

Em 2007, Yildirim *et. al.* (28) investigou a compatibilidade do osso de choco não processado no tecido humano. Juntamente com os seus colaboradores verificou que a composição mineral do osso de choco é compatível com tecidos humanos e sugeriram que este material enquanto *scaffold* para a regeneração de tecido ósseo era merecedor de mais estudos no futuro. (17) Em 2009 e 2010, Jasso-Gastinel *et. al.* (29) e Garcia-Enriquez *et. al.* (30) investigaram a utilização do osso de choco em cimentos acrílicos ósseos e verificaram uma boa osteointegração sem qualquer evidência de infecção secundária durante os testes *in vivo* que realizaram em coelhos. Verificaram que as propriedades mecânicas do cimento ósseo com 30% de osso de choco na sua constituição se encontravam dentro dos critérios *standard* aplicáveis para este tipo de cimentos, sendo comparáveis com as apresentações comerciais de cimentos ósseos comercializados. (17)

### Processamento HT

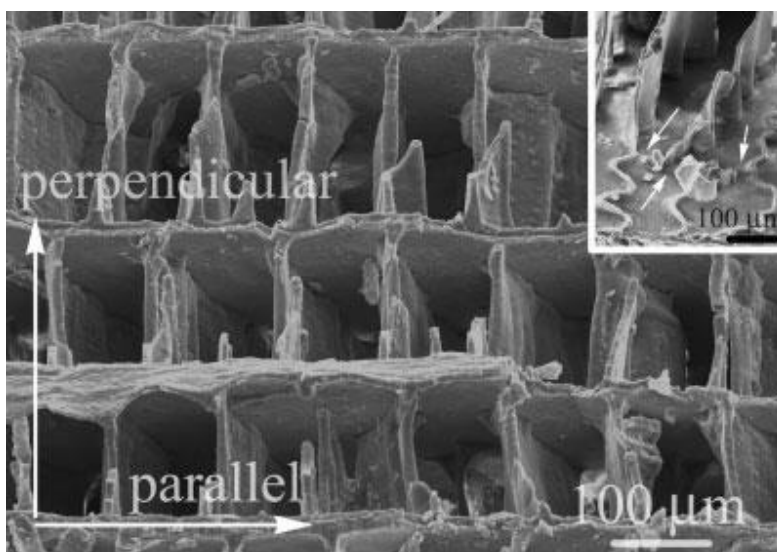
Outra abordagem na utilização do osso de choco em aplicações de engenharia de tecidos envolve o processamento HT da aragonite convertendo-a em hidroxiapatite (HA), uma cerâmica de fosfato de cálcio que já se comprovou apropriada para este tipo de utilizações. (17) Em 2005 e 2006, Rocha *et. al.* (18, 23) e em 2007 Kannan *et. al.* (31) recorreram à transformação HT para produção de *scaffolds* tecidulares. (17) Este foi o tipo de processamento usado neste trabalho para transformar as amostras.

Em baixo, a equação química que representa a transformação da aragonite do osso de choco ( $\text{CaCO}_3$ ) em HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) através do processamento HT. (31)



Mesmo após o processamento HT a estrutura porosa é conservada, não se alterando a microestrutura canalar do material (Figura 8). (23)





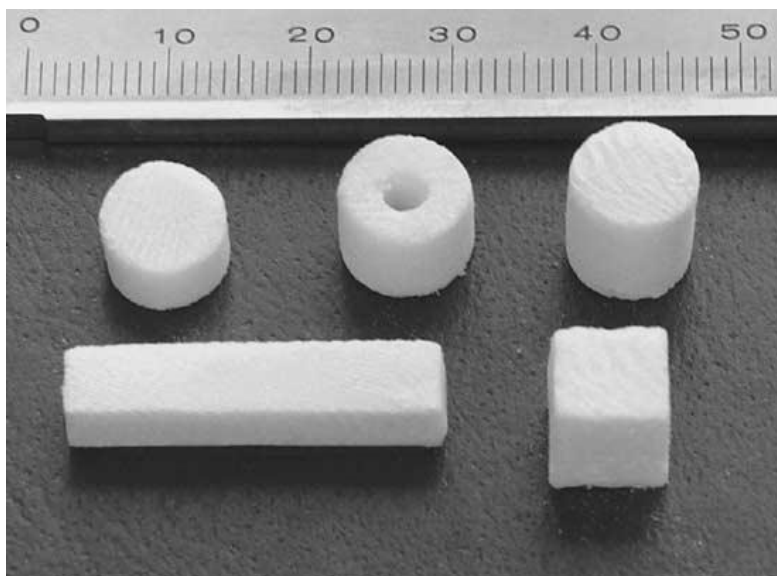
**Figura 8** - Estrutura porosa lamelar do osso de choco. As dimensões dos canais observados foram  $\approx 80 \mu\text{m}$  em largura e  $\approx 100 \mu\text{m}$  em altura. Esta fotografia pertence a uma amostra após 24h de processamento HT. Adaptado de (23).

O processo de transformação origina HA carbonatada mista do tipo A e B, similar à composição dos osso humano, em que apenas 1h de processamento HT é suficiente para transformar a aragonite em HA. (18,23)

Uma grande vantagem deste *scaffold* cerâmico é a possibilidade de poder satisfazer as exigências no que toca à bioatividade, bem como a qualquer solicitação no que toca à modelagem que, se pretendida, pode ser feita à medida para cada caso clínico – especialmente em casos de ossos muito danificados. (18)

O material pode ser maquinado de maneira a assumir qualquer formato pretendido (Figura 9), em qualquer uma das suas fases de processamento (antes ou depois da sinterização), permitindo satisfazer os mais exigentes requisitos técnicos no que toca à rapidez, personalização e confecção de um fragmento a ser implantado, o que tem particular relevância, por exemplo, em casos de ossos partidos devido a acidentes de viação (18) ou de forma a adaptar-se à forma de um alvéolo após a extração dentária. Blocos de fosfato de cálcio (como a HA obtida a partir do processamento HT do osso de choco) conseguem preencher defeitos ósseos com forma e tamanho previsíveis, mas não conseguem um bom contacto entre a superfície do bloco e o osso – nesse caso, a

utilização do material sob a forma de grânulos é a mais apropriada, adaptando o tamanho dos grânulos à dimensão dos defeitos mais comuns (na Medicina Dentária, os grânulos deverão ter  $< 1\text{ mm}$  de diâmetro). (7, 32)



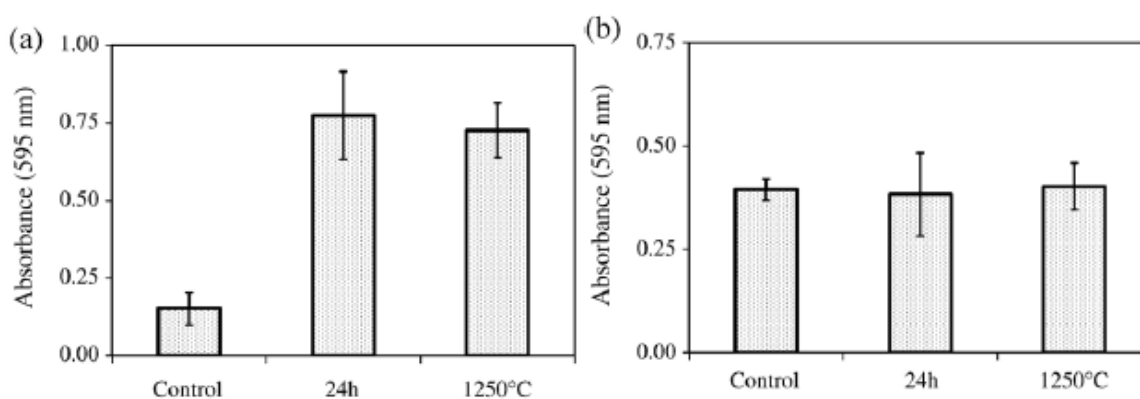
**Figura 9** - Os *scaffolds* podem ser maquinados com várias formatos de forma fácil, rápida e em qualquer fase do processamento (escala em mm). Adaptado de (18).

Para além da versatilidade no que toca à forma, estes *scaffolds* podem ter vários graus de bioatividade e de solubilidade – podem ir desde uma HA praticamente insolúvel até ao fosfato de cálcio solúvel (o produto iónico da *whitlockite*), dependendo dos objetivos de caso clínico. Materiais com grãos mais pequenos ou maior conteúdo de fase vítrea são mais solúveis que materiais mais cristalinos e grãos maiores. Para controlar o grau de solubilidade, apenas é necessário fazer variar a temperatura de sinterização. A temperatura de sinterização influencia significativamente a microestrutura dos *scaffolds*. (18)

Os resultados dos testes *in vitro* feitos por Rocha *et. al.* (18) com osteoblastos demonstram que os *scaffolds* produzidos a partir do osso de choco hidrotermalmente processado são apropriados para aplicações biológicas. Verificou-se também uma rápida e pronunciada formação de HA na superfície dos *scaffolds* após a imersão em SBF

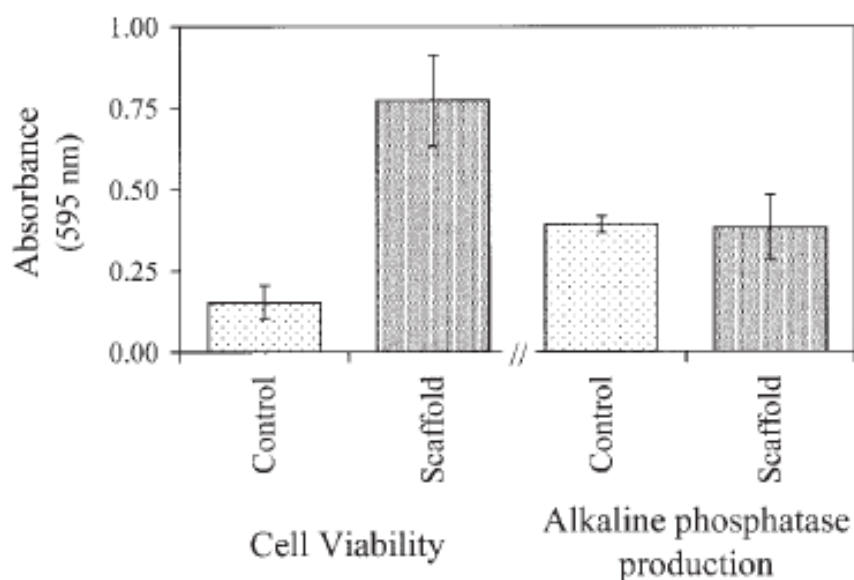
durante 1 e 2 semanas. (18). Também foi registada uma ótima proliferação de osteoblastos e uma biocompatibilidade com os osteoblastos muito boa. (18) Estes dados estão de acordo com as conclusões do estudo experimental de Okumuş *et. al.* (26), feito em 2005 com coelhos neozelandeses. Para além de bioativo (33), o material é também osteoindutivo. (34)

Rocha *et. al.* (18) concluíram que a HA obtida a partir de osso de choco tem uma excelente capacidade de biomineralização e, segundo estudos com materiais que incorporavam HA (35, 36) a presença da HA aumenta a viabilidade dos osteoblastos, não afetando a produção de fosfatase alcalina (FA). (18) No entanto, de acordo com Hongmin *et. al.* (34) a atividade da FA é maior no osso de choco hidrotermalmente processado que no osso de choco não processado. Na figura 10 está representado o aumento considerável da viabilidade/proliferação de osteoblastos na presença de pós obtidos através da trituração de *scaffolds* depois de processamento HT durante 24h (grupo 24h) e processamento HT durante 24h seguido de sinterização a 1250°C (grupo 1250°C). O grupo A (gráfico da esquerda) representa a análise de viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT e o grupo B (gráfico à direita) representa a análise de viabilidade celular através da produção da FA com a análise NBT-BCIP. (18)



**Figura 10** - Resultados da viabilidade/proliferação de osteoblastos depois de 72h de incubação. Os resultados representam duplicados de 8 (a) e 6 (b) experiências diferentes ( $p < 0.05$ ). Adaptado de (18).

O estudo realizado por Hongmin *et. al.* (34) em 2015 constata que, após 13 dias, as células estaminais mesenquimatosas na HA formada a partir do osso de choco aumentaram a quantidade de osteocalcina e FA, comparativamente ao osso de choco sem qualquer tipo de processamento HT. (34) Estudos *in vivo* comprovaram que a HA obtida a partir do tratamento HT do osso de choco conseguiu induzir a formação ectópica de osso, o que não aconteceu com o osso de choco não processado. (34) Comparativamente ao controlo (material não processado), o osso de choco submetido ao tratamento HT (*scaffold*) aumentou a viabilidade dos osteoblastos e não modificou a produção de FA (Figura 11). (23) Desta forma, o processamento HT poderá ser vantajoso ao nível do desempenho clínico do material, comparativamente ao osso de choco não processado, como o que foi usado em 2005 por Okumuş *et. al.* (26) na sua experiência com coelhos neozelandeses.



**Figura 11** - Os osteoblastos foram postos em contacto com os *scaffolds* sujeitos a 24h de HT. Depois de 24h de incubação avaliou-se a viabilidade/proliferação celular por análise MTT e a produção de FA pela análise NBT- BCIP. Os resultados representam valores médios. Adaptado de (23).

Segundo o estudo de Orkumuş *et. al.* (26) os dados obtidos no exame radiográfico, análise histológica, ressonância magnética e cintigrafia revelaram que o osso de choco sem processamento HT se posicionou no segundo lugar em termos de melhor desempenho no processo de cicatrização óssea de entre os 4 materiais testados (matriz óssea desmineralizada, osso de choco sem processamento HT, osso bovino esponjoso e trifosfato cálcico), revelando que este material tem capacidade osteocondutiva, é reabsorvível (dado que ao não sofrer processamento HT, a aragonite não é convertida em HA) e não interfere no processo de integração do enxerto. Além disso, a ausência de células gigantes em resposta à exposição dos tecidos do hospedeiro a este material demonstra que o osso de choco pode muito bem ser considerado uma nova opção para ser usado como xenoenxerto. (26)

Nove anos depois do estudo feito por Okumuş *et. al.* (26), Dogan *et. al.* (24) realizou um ensaio semelhante, mas com uma amostra significativamente maior e a introdução de um grupo controlo. Os autores deste estudo, baseando-se nos dados das análises clínica e histológica concluíram que o osso de choco aparenta ser um material compatível, que consegue estabelecer uma união óssea mais prematuramente sem causar dano oxidativo excessivo. Devido ao elevado grau de vascularização verificado no grupo do osso de choco e à aceleração da osteogénese e osteointegração, o osso de choco foi considerado o melhor material neste estudo. (24)

## Metais Pesados

Os metais pesados são todos os que possuem uma densidade superior a 5 g/cm<sup>3</sup> e provocam efeitos adversos ambientais e nos seres vivos. (37) Ao longo das últimas décadas foram várias as ações humanas que introduziram quantidades significativas de metais poluentes, quer estáveis quer radioativos nos ambientes marinhos. Muitos destes contaminantes são removidos da água do mar através de processos físico-químicos e biológicos, em que nestes últimos se inclui a incorporação nos organismos marinhos. (38, 39)

Apesar do curto ciclo de vida do choco, a forte capacidade deste animal acumular uma grande variedade de metais nos seus tecidos já foi demonstrada. (40-43)

A HA é conhecida por ter tendência a acumular vários metais e metalóides por adsorção, devido às características da sua superfície. Este mecanismo de adsorção tem como base uma troca iónica, envolvendo os iões  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{H}^+$  provenientes da HA. (44, 45) Vários estudos demonstram uma excelente capacidade de retenção e estabilização do Cd, Zn, Cu e Pb na estrutura da HA (45-71), revelando a afinidade de ligação destes metais à HA.

Assim, dada a origem biológica da HA produzida a partir do osso de choco, cujo *habitat* marinho possui metais pesados, levantam-se dúvidas relativamente à quantidade destes metais que possam estar presentes no produto da reação, bem como do risco que estes metais poderão acarretar ao implantar o material no osso humano e a sua possível migração para o meio biológico.

Enquanto a porção mineral do osso natural pode ser remodelada por ação dos osteoclastos, a HA sinterizada não é biodegradável, não sendo reabsorvida pelos osteoclastos. (32, 72-75) Estudos indicam que a taxa de dissolução da HA sinterizada é baixa (76-78), preservando o contorno de grânulos de HA sinterizada mesmo 4 semanas após ter sido implantada em modelos animais. (75) No entanto, uma das propriedades da HA obtida por tratamento HT de osso de choco é ser possível obter vários graus de solubilidade variando a temperatura de sinterização. (18)

Dada a inexistente reabsorção da HA sinterizada pelos osteoclastos e a forte ligação que estes metais divalentes possuem com a HA, coloca-se a hipótese da libertação destes metais pesados para o organismo ser nula ou muito residual, permanecendo na estrutura do *scaffold* da HA. A especiação destes metais é crucial na hora de avaliar a sua mobilidade e potencial toxicidade, dado que o seu comportamento é altamente dependente da sua forma química e estados de ligação. (79-82) Nos estudos *in vivo* em que foi feita a implantação de osso de choco em defeitos ósseos (24, 26) não foram observados quaisquer efeitos adversos relacionados com toxicidade por metais pesados, locais ou sistémicos. Porém, carecem de uma análise mais prolongada e dirigida à toxicidade causada por estes elementos.

Num estudo realizado em modelo animal (83) analisou-se o efeito de Cu e Zn sobre a viabilidade celular, tendo-se concluído que nas concentrações usadas nos ensaios não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controlo; na verdade, no caso do Zn observou-se um aumento significativamente estatístico da viabilidade celular. Desta forma, a presença de metais pesados em determinadas concentrações poderá não ter apenas efeitos nefastos, mas até ser benéfico para o metabolismo ósseo, pelo que a sua presença em materiais para regeneração óssea deverá ser cuidadosamente ponderada.

O Zn registou concentrações médias inferiores aos valores diários de referência da OMS. (92)

O Cu e Hg registaram concentrações médias nas amostras analisadas inferiores aos limites estabelecidos pela CE (9, 10) no músculo de choco destinado à ingestão, inferiores ao valor de exposição diária permitida pela FDA e inferiores aos valores diários máximos permitidos ao elemento ao integrar fármacos e derivados como impureza, válidos para administração por via parentérica. (8)

As concentrações médias de Pb foram superiores às permitidas pela CE (9, 10) no músculo de choco destinado à ingestão e superiores ao valor de exposição diária permitida pela FDA e superiores aos valores diários máximos permitidos ao elemento ao integrar fármacos e derivados como impureza, válidos para administração por via parentérica. (8)

Relativamente ao Cd, as concentrações médias nas amostras testadas foram inferiores aos limites estabelecidos pela CE (9, 10) no músculo de choco destinado à ingestão, inferiores ao valor de exposição diária permitida pela FDA mas superiores aos valores diários máximos permitidos ao elemento ao integrar fármacos e derivados como impureza, válidos para administração por via parentérica. (8)

Apesar do Pb e Cd demonstrarem concentrações médias superiores às permitidas, deverá ter-se em linha de conta que os valores de referência utilizados dizem respeito à via de administração parentérica quando o material é na verdade implantado, pressupondo uma biodisponibilidade de 100%, o que não acontece *in vivo*. Além disso, deverá considerar-se a grande afinidade dos metais pela HA, bem como o

baixo grau de reabsorção do *scaffold* e, portanto, a libertação residual de metais para o meio biológico.

### Processamento HT e concentrações de metais pesados analisados

Entre os grupos A1 e A2 e entre os grupos B1 e B2 observaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) nas concentrações dos metais Pb, Cu e Zn, em que se verificou um aumento na concentração do Cu e Zn nas amostras processadas e uma diminuição da concentração do Pb. Assim, o tratamento HT parece afetar significativamente a concentração de metais nas amostras, destacando-se a diminuição da concentração de Pb como uma clara vantagem do processamento HT.

Esta variação pode ser justificada pela tendência dos metais presentes no material inicial, para serem adsorvidos à superfície das fases de fosfato de cálcio formadas durante a transformação HT ou eventualmente de entrarem na sua estrutura, e de permanecerem no material processado, aumentando assim a sua concentração. A presença de matéria orgânica na constituição do material inicial, a qual desaparece ao ser processado, também ajuda a explicar as diferenças observadas.

### Local de recolha e concentrações de metais pesados analisados

Entre os grupos de amostras não processadas recolhidas em locais diferentes (A1 e B1) houve diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) relativamente às concentrações de Pb, Cu e Zn, sendo que o grupo A1 registou concentrações médias superiores de Pb e Cu e menores de Zn.

Entre os grupos de amostras processadas recolhidas em locais diferentes (A2 e B2) houve diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) relativamente às concentrações de Cu, Cd e Zn, sendo que o grupo A2 registou concentrações médias de Cu e Cd superiores, mas uma concentração média inferior de Zn. As diferenças na concentração média de Pb não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos A2 e B2.



Tendo em conta estes valores será relevante especificar o local de recolha do material, de forma a diminuir a variabilidade na composição do biomaterial a ser implantado.

# Conclusões

## Conclusões

A avaliação dos metais pesados presentes nas amostras de osso de choco utilizadas neste estudo revelou alguma variabilidade no que refere aos parâmetros analisados:

- Os diferentes metais encontram-se em diferentes concentrações, sendo o Pb o que apresentou os valores acima dos recomendados por instituições regulamentares; O Cd está dentro dos valores recomendados por duas das instituições regulamentares e superior apenas no que refere à administração por via parentérica. O Cu e Hg apresentaram valores dentro do intervalo permitido pelas referidas instituições;
- O tratamento hidrotermal das amostras é favorável no que diz respeito a todos os valores analisados, principalmente na diminuição dos valores de Pb.
- O local de recolha das amostras influencia os valores referentes aos diferentes metais pesados quantificados.

A literatura refere que a farmacocinética, biodisponibilidade e velocidade de absorção dos metais, bem como o grau de solubilidade do *scaffold* são dados de extrema relevância na hora de avaliar a perigosidade dos metais incluídos no material a implantar

Neste contexto, e com o intuito de confirmar e tentar solucionar a problemática levantada com os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se para trabalhos futuros a realização de co-culturas com osteoblastos e osteoclastos, com quantificação de metais pesados presentes no meio de cultura que possam ter sido libertados pela HA obtida por processamento HT do osso de choco.

A utilização de métodos adicionais de processamento do material com vista a diminuir as concentrações de chumbo e cádmio é recomendável, caso de verifique a sua libertação do *scaffold* para o meio fisiológico.

## Referências bibliográficas

1. Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A Review on Alveolar Ridge Preservation Following Tooth Extraction. J Evid Based Dent Pract. 2012;12(3):149-60.
2. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. J Clin Periodontol. 2004;31(10):820-8.
3. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent. 2003;23(4):313-23.
4. Tan WL, Wong TL, Wong MC, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. Clin Oral Implants Res. 2012 Feb;23 Suppl 5:1-21.
5. Prasad D, Shetty M, Bansal N, Hegde C. Crestal bone preservation: A review of different approaches for successful implant therapy. Indian J Dent Res. 2011;22(2):317-23.
6. McKinney Jr RV, Steflik DE, Koth DL. The biologic response to the single-crystal sapphire endosteal dental implant: Scanning electron microscopic observations. J Prosthet Dent. 1984;51(3):372-9.
7. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials. 2004;25(6):987-94.
8. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. Q3D Elemental Impurities - Guidance for Industry. [Internet]. 2015 [cited 2015 Nov 16]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm371025.pdf>.
9. Comissão Europeia. Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. [Internet]. 2006 [cited 2016 Feb 15]; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>.
10. Comissão Europeia. Regulamento (UE) Nº 420/2011 da Comissão de 29 de Abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) nº 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. [Internet]. 2011 [cited 2016 Feb 15]; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0420&from=PT>.
11. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. Int J Polym Sci. 2011.
12. Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. J Periodontol. 2008;79(8):1370-7.

13. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;90(5):581-6.
14. Bolouri A, Haghighat N, Frederiksen N. Evaluation of the effect of immediate grafting of mandibular postextraction sockets with synthetic bone. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22(11):955-8.
15. Pelegri AA, Da Costa CES, Correa MEP, Marques JFC. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):535-42.
16. Festa VM, Addabbo F, Laino L, Femiano F, Rullo R. Porcine-Derived Xenograft Combined with a Soft Cortical Membrane versus Extraction Alone for Implant Site Development: A Clinical Study in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(5):707-13.
17. Cadman J, Zhou S, Chen Y, Li Q. Cuttlebone: Characterisation, Application and Development of Biomimetic Materials. *J Bionic Eng.* 2012;9(3):367-76.
18. Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Valério P, Kannan S, Oktar FN, et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone.* 2005;37(6):850-7.
19. Murugan R, Ramakrishna S, Panduranga Rao K. Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone. *Mater Lett.* 2006;60(23):2844-7.
20. Birchall JD, Thomas NL. On the architecture and function of cuttlefish bone. *J Mater Sci.* 1983;18(7):2081-6.
21. Gower D, Vincent JFV. The mechanical design of the cuttlebone and its bathymetric implications. *Biomimetics.* 1996;4:37-57.
22. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(6):523-30.
23. Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Kannan S, Valério P, Ferreira JMF. Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones. *J Biomed Mater Res Part A.* 2006;77A(1):160-8.
24. Dogan E, Okumuş Z. Cuttlebone used as a bone xenograft in bone healing. *Vet Med-Czech.* 2014;59(5):254-60.
25. Ivankovic H, Gallego Ferrer G, Tkalec E, Orlic S, Ivankovic M. Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(5):1039-46.
26. Okumuş Z, Yildirim ÖS. The Cuttlefish Backbone: A New Bone Xenograft Material? *Turk J Vet Anim Sci.* 2005;29(5):1177-84.
27. Mizuno M, Fukunaga K. Analysis of tissue condition based on interaction between inorganic and organic matter in cuttlefish bone. *J Biol Phys.* 2013;39(1):123-30.

28. Yildirim OS, Okumus Z, Kizilkaya M, Ozdemir Y, Durak R, Okur A. Comparative quantitative analysis of sodium, magnesium, potassium and calcium in healthy cuttlefish backbone and non-pathological human elbow bone. *Can J Anal Sci Spect.* 2007;52:270-5.
29. Jasso-Gastinel CF, Enriquez SG, Flores J, Reyes-González I, Mijares EM. Acrylic Bone Cements Modified With Bioactive Filler. *Macromol Symp.* 2009;283–284(1):159-66.
30. Garcia-Enriquez S, Guadarrama HE, Reyes-Gonzalez I, Mendizabal E, Jasso-Gastinel CF, Garcia-Enriquez B, et al. Mechanical performance and in vivo tests of an acrylic bone cement filled with bioactive *sepia officinalis* cuttlebone. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21:113-25.
31. Kannan S, Rocha JHG, Agathopoulos S, Ferreira JMF. Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Acta Biomater.* 2007;3(2):243-9.
32. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater Today.* 2016;19(2):69-87.
33. Milovac D, Gallego Ferrer G, Ivankovic M, Ivankovic H. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;34:437-45.
34. Hongmin L, Wei Z, Xingrong Y, Jing W, Wenxin G, Jihong C, et al. Osteoinductive nanohydroxyapatite bone substitute prepared via in situ hydrothermal transformation of cuttlefish bone. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials.* 2015;103(4):816-24.
35. Calandrelli L, Immirzi B, Malinconico M, Orsello G, Volpe M, Ragione FD, et al. Biocompatibility studies on biodegradable polyester-based composites of human osteoblasts: A preliminary screening. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(4):611-7.
36. Shamsuria O, Fadilah A, Asiah A, Rodiah M, Suzina A, Samsudin A. In vitro cytotoxicity evaluation of biomaterials on human osteoblast cells CRL-1543; hydroxyapatite, natural coral and polyhydroxybutyrate. *Med J Malaysia.* 2004;59:174-5.
37. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* 2014;7(2):60-72.
38. Cardellicchio N, Buccolieri A, di Leo A, Spada L. Heavy Metals in Marine Sediments from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Ann Chim.* 2006;96(11-12):727-41.
39. Desideri D, Meli MA, Roselli C. A biomonitoring study: 210Po and heavy metals in marine organisms from the Adriatic Sea (Italy). *J Radioanal Nucl Chem.* 2010;285(2):373-82.
40. Declair W, Vlaeminck A, Geladi P, Van Grieken R. Determination of protein-bound copper and zinc in some organs of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Comp Biochem Physiol Part B Comparative Biochemistry.* 1978;60(4):347-50.
41. Miramand P, Bentley D. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Mar Biol.* 1992;114(3):407-14.

42. Bustamante P. Etude des processus de bioaccumulation et de détoxification d'éléments traces (métaux lourds et terres rares) chez les mollusques céphalopodes et bivalves pectinidés. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les prédateurs. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les prédateurs. PhD [thesis]. University of La Rochelle France. 1998.
43. Miramand P, Bustamante P, Bentley D, Kouéta N. Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Sci Total Environ*. 2006;361(1):132-43.
44. Kadouche S, Zemmouri H, Benaoumeur K, Drouiche N, Sharrock P, Lounici H. Metal Ion Binding on Hydroxyapatite (Hap) and Study of the Velocity of Sedimentation. *Procedia Eng*. 2012;33:377-84.
45. del Rio JG, Sanchez P, Morando PJ, Cicerone DS. Retention of Cd, Zn and Co on hydroxyapatite filters. *Chemosphere*. 2006;64(6):1015-20.
46. Suzuki T, Hatsushika T, Hayakawa Y. Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers. *J Chem Soc Faraday Trans: Physical Chemistry in Condensed Phases*. 1981;77(5):1059-62.
47. Carroll SA, Bruno J. Mineral-solution interactions in the U (VI)-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O system. *Radiochim Acta*. 1991;52(1):187-94.
48. Reichert J, Binner J. An evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions. *J Mater Sci*. 1996;31(5):1231-41.
49. Chen X, Wright JV, Conca JL, Peurrung LM. Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite. *Environ Sci Technol*. 1997;31(3):624-31.
50. Vega E, Pedregosa J, Narda G. Interaction of oxovanadium (IV) with crystalline calcium hydroxyapatite: surface mechanism with no structural modification. *J Phys Chem Solids*. 1999;60(6):759-66.
51. Leyva A, Marrero J, Smichowski P, Cicerone D. Antimony sorption on hydroxyapatite suspended in aqueous solutions. *Environ Sci Technol*. 2001;35:3669-75.
52. McGrellis S, Serafini J-N, JeanJean J, Pastol J-L, Fedoroff M. Influence of the sorption protocol on the uptake of cadmium ions in calcium hydroxyapatite. *Separ Purif Technol*. 2001;24(1):129-38.
53. Wang Y, Chen T, Yeh K, Shue M. Stabilization of an elevated heavy metal contaminated site. *J Hazard Mater*. 2001;88(1):63-74.
54. Fuller C, Bargar J, Davis J, Piana M. Mechanisms of uranium interactions with hydroxyapatite: Implications for groundwater remediation. *Environ Sci Technol*. 2002;36(2):158-65.
55. Czerniczyniec M, Farias S, Magallanes J, Cicerone D, editors. Arsenic adsorption on biogenic HAP: solution composition effects. 11th International Conference on Surface and Colloid Science, Foz do Iguazu, Brazil; 2003.

56. del Rio JG, Morando P, Cicerone D. Natural materials for treatment of industrial effluents: comparative study of the retention of Cd, Zn and Co by calcite and hydroxyapatite. Part I: batch experiments. *J Environ Manage*. 2004;71(2):169-77.
57. Zhang Z, Li M, Chen W, Zhu S, Liu N, Zhu L. Immobilization of lead and cadmium from aqueous solution and contaminated sediment using nano-hydroxyapatite. *Environ Pollut*. 2010;158(2):514-9.
58. Mobasherpour I, Salahi E, Pazouki M. Removal of divalent cadmium cations by means of synthetic nano crystallite hydroxyapatite. *Desalination Water Treat*. 2011;266(1):142-8.
59. He M, Shi H, Zhao X, Yu Y, Qu B. Immobilization of Pb and Cd in contaminated soil using nano-crystallite hydroxyapatite. *Procedia Environ Sci*. 2013;18:657-65.
60. Taneez M, Marmier N, Hurel C. Use of neutralized industrial residue to stabilize trace elements (Cu, Cd, Zn, As, Mo, and Cr) in marine dredged sediment from South-East of France. *Chemosphere*. 2016;150:116-22.
61. Mignardi S, Corami A, Ferrini V. Evaluation of the effectiveness of phosphate treatment for the remediation of mine waste soils contaminated with Cd, Cu, Pb, and Zn. *Chemosphere*. 2012;86(4):354-60.
62. Shen Q, Luo L, Bian L, Liu Y, Yuan B, Liu C, et al. Lead cations immobilization by hydroxyapatite with cotton-like morphology. *J Alloys Compd*. 2016;673:175-81.
63. Smičiklas I, Onjia A, Raičević S, Janačković Đ, Mitrić M. Factors influencing the removal of divalent cations by hydroxyapatite. *J Hazard Mater*. 2008;152(2):876-84.
64. Kaludjerovic-Radoicic T, Raicevic S. Aqueous Pb sorption by synthetic and natural apatite: kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. *Chem Eng J*. 2010;160(2):503-10.
65. Zhu R, Yu R, Yao J, Mao D, Xing C, Wang D. Removal of Cd 2+ from aqueous solutions by hydroxyapatite. *Catal Today*. 2008;139(1):94-9.
66. Corami A, Mignardi S, Ferrini V. Cadmium removal from single-and multi-metal (Cd+ Pb+ Zn+ Cu) solutions by sorption on hydroxyapatite. *J Colloid Interface Sci*. 2008;317(2):402-8.
67. Sheha R. Sorption behavior of Zn (II) ions on synthesized hydroxyapatites. *J Colloid Interface Sci*. 2007;310(1):18-26.
68. Corami A, Mignardi S, Ferrini V. Copper and zinc decontamination from single-and binary-metal solutions using hydroxyapatite. *J Hazard Mater*. 2007;146(1):164-70.
69. Šljivić M, Smičiklas I, Plečaš I, Mitrić M. The influence of equilibration conditions and hydroxyapatite physico-chemical properties onto retention of Cu 2+ ions. *Chem Eng J*. 2009;148(1):80-8.
70. Smičiklas I, Dimović S, Plečaš I, Mitrić M. Removal of Co 2+ from aqueous solutions by hydroxyapatite. *Water Res*. 2006;40(12):2267-74.



71. Corami A, D'Acapito F, Mignardi S, Ferrini V. Removal of Cu from aqueous solutions by synthetic hydroxyapatite: EXAFS investigation. *Mater Sci Eng C Mater Bio Appl*. 2008;149(2):209-13.
72. Linhart W, Briem D, Amling M, Rueger JM, Windolf J. Mechanisches Versagen einer porösen Hydroxylapatitkeramik 7,5 Jahre nach Implantation an der proximalen Tibia. *Der Unfallchirurg*. 107(2):154-7.
73. Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1998;39(4):603-10.
74. Dersot JM, Colombier ML, Lafont J, Baroukh B, Septier D, Saffar JL. Multinucleated giant cells elicited around hydroxyapatite particles implanted in craniotomy defects are not osteoclasts. *Anat Rec*. 1995;242(2):166-76.
75. Ayukawa Y, Suzuki Y, Tsuru K, Koyano K, Ishikawa K. Histological Comparison in Rats between Carbonate Apatite Fabricated from Gypsum and Sintered Hydroxyapatite on Bone Remodeling. *BioMed Res Int*. 2015;2015:7.
76. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001;71(6):354-61.
77. Legeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*. 1993;14(1):65-88.
78. Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials*. 2002;23(3):751-5.
79. Gu Y-G, Lin Q, Yu Z-L, Wang X-N, Ke C-L, Ning J-J. Speciation and risk of heavy metals in sediments and human health implications of heavy metals in edible nekton in Beibu Gulf, China: A case study of Qinzhou Bay. *Marine Poll Bull*. 2015;101(2):852-9.
80. Gao X, Chen C-TA. Heavy metal pollution status in surface sediments of the coastal Bohai Bay. *Water Res*. 2012;46(6):1901-11.
81. Gleyzes C, Tellier S, Astruc M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *Trac-Trends Anal Chem*. 2002;21(6):451-67.
82. Sutherland RA. BCR®-701: A review of 10-years of sequential extraction analyses. *Anal Chim Acta*. 2010;680(1):10-20.
83. Le Bihan E, Perrin A, Koueta N. Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L.(Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *J Exp Mar Bio Eco*. 2004;309(1):47-66.
84. Seixas FLS. *Análise de Metais Pesados em Ruivo: (Chelidonichthys lucernus, LINNAEUS, 1758)*. Porto: Universidade do Porto; 2008.
85. Salbu B, Steinnes E. Trace Elements in the oceans. In: J. R. Donat, Bruland KW, editors. *Trace Elements in Natural Waters*. Boca Raton, Florida: CRC-Press; 1995. p. 247-81.

86. Millero FJ. Chemical Oceanography. 3<sup>a</sup> ed. Miami: CRC Press; 2006.
87. World Health Organization. Cadmium - Environmental Health Criteria 134. [Internet]. 2015 [cited 2016 Feb 29]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>.
88. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Cadmium. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. [Internet] Atlanta. 1999 [cited 2016 29 Feb]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>.
89. World Health Organization. Copper. Environmental Health Criteria 200. [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 6]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>.
90. Roychoudhury S, Nath S, Massanyi P, Stawarz R, Kacaniova M, Kolesarova A. Copper induced changes in reproductive functions: review of in vivo and in vitro effects. *Physiol Res*. 2015; 65(1).
91. Sprague JB. Toxicity and tissue concentrations of lead, zinc, and cadmium for marine molluscs and crustaceans. Research Triangle Park, NC: International Lead Zinc Research Organization. 1987.
92. World Health Organization. Zinc. Environment Health Criteria 221. [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 9]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc221.htm>.
93. United States Environment Protection Agency. Ambient water quality criteria for zinc - 1987. United States Environment Protection Agency Report 440/5-87-003. 1987:1-207.
94. Yeats PA. The distribution of trace metals in ocean waters. *Sci Total Environ*. 1988;72:131-49.

# Anexos

**Anexo I - Concentrações de metais pesados no Oceano e limites estabelecidos pela CE**

<b>Metal</b>	<b>Concentração no Oceano</b>	<b>Quantidade máxima permitida nos cefalópodes segundo o Regulamento (CE) nº 1881/2006 (9), modificado em 2011 pelo Regulamento (UE) nº 420/2011 (10)</b>
<b>Chumbo</b>	Os níveis médios rondam os 0.005 µg/L. (84) No Oceano Atlântico oscila entre os 100 pmol/kg e 150 pmol/kg em águas superficiais e 20 pmol/kg em águas mais profundas. (84-86)	1.0 µg/g de peso fresco para cefalópodes destinados ao consumo humano, sem vísceras.
<b>Cádmio</b>	Pode oscilar entre 0.01 até 0.1mg/L (84, 87, 88); No Norte do Oceano Atlântico, varia entre os 100 e 200 pmol/kg à superfície e em águas mais profundas atinge os 300 pmol/kg. (85, 86)	1.0 µg/g de peso fresco para cefalópodes destinados ao consumo humano, sem vísceras.
<b>Mercúrio</b>	Varia entre 1 e 7 pmol/kg nas zonas mais superficiais e em águas profundas é de aproximadamente de 1 pmol/kg. (85)	0,50 µg/g de peso fresco para cefalópodes destinados ao consumo humano, sem vísceras.
<b>Cobre</b>	Aproximadamente de 0.15 µg/L. (89)	N.D. Segundo a OMS, o limite máximo de ingestão diária de cobre poderá ser superior a 2-3 mg. (90)
<b>Zinco</b>	Varia entre os 0.0005-0.026 µg/L (91, 92), com valores entre os 0.002-0.1 µg/L em águas abertas. (93) No Norte do Oceano Atlântico, a concentração aos 20 metros de profundidade é de 0.065µg/L e aos 3715 metros é de 0.124 µg/L. (92, 94)	N.D. A quantidade de zinco incorporada no organismo humano, considerando todas as fontes pela qual esta entrada possa ocorrer será aprox. 4.7 a 16 mg por dia, sendo os alimentos ingeridos a principal fonte. (92)

## Anexo II - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Pb

Grupo	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>A1</b>	32	33,1667	4,87511
	33		
	30		
	27		
	41		
	36		
<b>A2</b>	20	18,1667	1,83485
	20		
	18		
	18		
	18		
	15		
<b>B1</b>	30	27,8333	1,72240
	29		
	26		
	29		
	26		
	27		
<b>B2</b>	18	17,8333	3,60093
	20		
	22		
	14		
	20		
	13		

### Estatísticas Descritivas

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
ChumboA1	6	27,00	41,00	33,1667	4,87511
ChumboA2	6	15,00	20,00	18,1667	1,83485
ChumboB1	6	26,00	30,00	27,8333	1,72240
ChumboB2	6	13,00	22,00	17,8333	3,60093
N válido (listwise)	6				

### Anexo III - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Cu

Grupo	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>A1</b>	4,8	4,8333	0,16330
	4,9		
	5,1		
	4,8		
	4,6		
	4,8		
<b>A2</b>	5,5	5,1833	0,26394
	5,5		
	5,2		
	5,0		
	5,0		
	4,9		
<b>B1</b>	4,0	4,0000	0,08944
	4,1		
	4,0		
	3,9		
	4,1		
	3,9		
<b>B2</b>	4,2	4,1667	0,08165
	4,2		
	4,2		
	4,2		
	4,2		
	4,0		

#### Estatísticas Descritivas

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
CobreA1	6	4,60	5,10	4,8333	,16330
CobreA2	6	4,90	5,50	5,1833	,26394
CobreB1	6	3,90	4,10	4,0000	,08944
CobreB2	6	4,00	4,20	4,1667	,08165
N válido (listwise)	6				

#### Anexo IV - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Cd

Grupo	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>A1</b>	<0,4 <0,4 <0,4 <0,4 <0,4 <0,4	<0,4	N.D
<b>A2</b>	1,7 1,1 1,1 1,3 1,3 1,8	1,3833	0,29944
<b>B1</b>	<0,3 <0,3 <0,3 <0,3 <0,3 <0,3	<0,3	N.D
<b>B2</b>	0,9 0,7 0,8 0,5 0,5 1,1	0,7500	0,23452

#### Estatísticas Descritivas

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
CádmioA1	0				
CádmioA2	6	1,10	1,80	1,3833	,29944
CádmioB1	0				
CádmioB2	6	,50	1,10	,7500	,23452
N válido (listwise)	0				

## Anexo V - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Zn

Grupo	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>A1</b>	19	19,3333	0,57735
	20		
	19		
<b>A2</b>	22	22,6667	0,57735
	23		
	23		
<b>B1</b>	34	33,6667	0,57735
	33		
	34		
<b>B2</b>	44	43,3333	1,15470
	42		
	44		

Estatísticas Descritivas					
	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
ZincoA1	3	19,00	20,00	19,3333	,57735
ZincoA2	3	22,00	23,00	22,6667	,57735
ZincoB1	3	33,00	34,00	33,6667	,57735
ZincoB2	3	42,00	44,00	43,3333	1,15470
N válido (listwise)	3				



## Anexo VI - Tratamento estatístico das leituras obtidas na espectrometria do Hg

Grupo	Concentração (ng/g)	Média (ng/g)	Desvio-padrão (ng/g)
<b>A1</b>	< 28	< 28	N.D.
	< 28		
	< 28		
<b>A2</b>	< 34	< 34	N.D.
	< 34		
	< 34		
<b>B1</b>	< 22	< 22	N.D.
	< 22		
	< 22		
<b>B2</b>	< 34	< 34	N.D.
	< 34		
	< 34		

**Anexo VII – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras sem (A1) e com o processamento hidrotermal (A2), recolhidas no mesmo local A**

**Teste Mann-Whitney**

Postos				
	Grupo	N	Posto Médio	Soma de Postos
Concentração_Pb	A1	6	9,50	57,00
	A2	6	3,50	21,00
	Total	12		
Concentração_Cu	A1	6	4,08	24,50
	A2	6	8,92	53,50
	Total	12		
Concentração_Zn	A1	3	2,00	6,00
	A2	3	5,00	15,00
	Total	6		

Estatísticas de teste <sup>a</sup>			
	Concentração_ Pb	Concentração_ Cu	Concentração_ Zn
U de Mann-Whitney	,000	3,500	,000
Wilcoxon W	21,000	24,500	6,000
Z	-2,908	-2,351	-2,023
Significância Assint. (Bilateral)	<b>,004</b>	<b>,019</b>	<b>,043</b>
Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	,002 <sup>b</sup>	,015 <sup>b</sup>	,100 <sup>b</sup>

a. Variável de Agrupamento: Grupo

b. Não corrigido para empates.

**Anexo VIII – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras sem (B1) e com o processamento hidrotermal (B2), recolhidas no mesmo local B**

**Teste Mann-Whitney**

Postos				
	Grupo	N	Posto Médio	Soma de Postos
Concentração_Pb	B1	6	9,50	57,00
	B2	6	3,50	21,00
	Total	12		
Concentração_Cu	B1	6	4,00	24,00
	B2	6	9,00	54,00
	Total	12		
Concentração_Zn	B1	3	2,00	6,00
	B2	3	5,00	15,00
	Total	6		

Estatísticas de teste <sup>a</sup>			
	Concentração_ Pb	Concentração_ Cu	Concentração_ Zn
U de Mann-Whitney	,000	3,000	,000
Wilcoxon W	21,000	24,000	6,000
Z	-2,898	-2,519	-2,023
Significância Assint. (Bilateral)	<b>,004</b>	<b>,012</b>	<b>,043</b>
Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	,002 <sup>b</sup>	,015 <sup>b</sup>	,100 <sup>b</sup>

a. Variável de Agrupamento: Grupo

b. Não corrigido para empates.

**Anexo IX – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras sem processamento hidrotermal (A1 e B1), recolhidas em locais diferentes A e B**

**Teste Mann-Whitney**

Postos				
	Grupo	N	Posto Médio	Soma de Postos
Concentração_Pb	A1	6	8,83	53,00
	B1	6	4,17	25,00
	Total	12		
Concentração_Cu	A1	6	9,50	57,00
	B1	6	3,50	21,00
	Total	12		
Concentração_Zn	A1	3	2,00	6,00
	B1	3	5,00	15,00
	Total	6		

Estatísticas de teste <sup>a</sup>			
	Concentração_ Pb	Concentração_ Cu	Concentração_ Zn
U de Mann-Whitney	4,000	,000	,000
Wilcoxon W	25,000	21,000	6,000
Z	-2,258	-2,918	-2,023
Significância Assint. (Bilateral)	<b>,024</b>	<b>,004</b>	<b>,043</b>
Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	,026 <sup>b</sup>	,002 <sup>b</sup>	,100 <sup>b</sup>

a. Variável de Agrupamento: Grupo

b. Não corrigido para empates.

**Anexo X – Tratamento estatístico da comparação de concentrações entre grupos de amostras com processamento hidrotermal (A2 e B2), recolhidas em locais diferentes A e B**

**Teste Mann-Whitney**

Postos				
	Grupo	N	Posto Médio	Soma de Postos
Concentração_Pb	A2	6	6,42	38,50
	B2	6	6,58	39,50
	Total	12		
Concentração_Cu	A2	6	9,50	57,00
	B2	6	3,50	21,00
	Total	12		
Concentração_Zn	A2	3	2,00	6,00
	B2	3	5,00	15,00
	Total	6		
Concentração_Cd	A2	6	9,33	56,00
	B2	6	3,67	22,00
	Total	12		

Estatísticas de teste <sup>a</sup>				
	Concentração_ Pb	Concentração_ Cu	Concentração_ Zn	Concentração_ Cd
U de Mann-Whitney	17,500	,000	,000	1,000
Wilcoxon W	38,500	21,000	6,000	22,000
Z	-,083	-3,000	-2,023	-2,751
Significância Assint. (Bilateral)	<b>,934</b>	<b>,003</b>	<b>,043</b>	<b>,006</b>
Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	,937 <sup>b</sup>	,002 <sup>b</sup>	,100 <sup>b</sup>	,004 <sup>b</sup>

a. Variável de Agrupamento: Grupo

b. Não corrigido para empates.

#### Anexo XI - Concentrações limite estabelecidas pela FDA (8)

Metal	Exposição diária permitida por via parentérica (µg/dia)	Concentrações permitidas para impurezas em produtos, substâncias e excipientes farmacêuticos, válidas para administrações parentéricas não superiores a 10 g diárias
<b>Chumbo</b>	5	0,5
<b>Cádmio</b>	2	0,2
<b>Mercúrio</b>	3	0,3
<b>Cobre</b>	300	30
<b>Zinco</b>	Não existe	Não existe

A FDA prevê situações para as quais haja maiores concentrações de metais em fármacos e derivados, nomeadamente em casos de administração única, como é o caso da implantação de HA obtida a partir de osso de choco em alvéolos imediatamente após a extração dentária.

## Anexo XII – Declaração de autorização da Direção Geral de Alimentação e Veterinária

Exmo.(s) Senhor(es),

Em resposta ao V. e-mail de 25.02.2016, relativamente ao pedido de autorização que nos foi formulado para a recolha, transporte e utilização de subprodutos animais de categoria 3, provenientes de peixarias locais da cidade de Aveiro, nomeadamente, osso/casca de choco para fins específicos de investigação, informa-se V.<sup>a</sup> Ex.<sup>a</sup>, que ao abrigo do disposto no Artigo 17.º do Regulamento (CE) n.º 1069/2009 de 21 de Outubro, é autorizado o manuseamento e utilização de subprodutos animais de categoria 3, destinados a fins de investigação, desde que, para garante do controlo dos riscos para a saúde pública e animal, sejam cumpridas as seguintes condições:

- O operador dos subprodutos animais para diagnóstico e investigação, deve tomar todas as medidas necessárias para evitar a propagação de doenças transmissíveis aos seres humanos ou aos animais durante o manuseamento das matérias sob a sua responsabilidade, sobretudo através da aplicação de boas práticas de laboratório.
- É proibida qualquer utilização subsequente dos subprodutos animais, para outros fins que não o exame no âmbito das atividades autorizadas.
- O transporte até ao destino final deve ser efetuado em embalagem, veículo ou contentor adequado para o efeito e identificados com a menção «Categoria 3 – Destinados à investigação e ao diagnóstico»;
- A menos que sejam conservadas para efeitos de referência, as amostras para diagnóstico e investigação, e quaisquer produtos derivados da utilização dessas amostras, devem ser eliminados:
  - a) Como resíduos, por incineração ou co-incineração;
  - b) No caso dos subprodutos animais ou produtos derivados referidos no artigo 8.º, alínea a), subalínea iv), no artigo 8.º, alínea c) e alínea d), no artigo 9.º e no artigo 10.º do Regulamento (CE) n.º 1069/2009 que fazem parte de culturas de células, kits de laboratório ou amostras de laboratório, através de um tratamento em condições que são pelo menos equivalentes ao método validado para autoclaves a vapor [1] e subsequente eliminação como resíduos ou águas residuais, em conformidade com a legislação pertinente da União.

[1] CEN TC/102 - Esterilizadores para fins médicos - EN 285:2006 + A2:2009 - Esterilização – Esterilizadores a vapor – Grandes esterilizadores; referência publicada no JO C 293 de 2.12.2009, p. 39.
  - c) Por esterilização sob pressão e subsequente eliminação ou utilização, em conformidade com os artigos 12.º, 13.º e 14.º do Regulamento (CE) n.º 1069/2009.
  - d) O utilizador deve proceder a um registo datado dos subprodutos animais utilizados, que deve especificar a descrição das matérias, espécie animal, categoria, quantidade, data, local de origem, nome do expedidor, nome do utilizador e método de eliminação das amostras e de quaisquer produtos derivados.

Mais se informa que, nos termos do disposto na alínea a), n.º 1 do Artigo 23.º do Regulamento (CE) n.º 1069/2009 de 21 de Outubro, foi atribuído à **FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**, sita na Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, o número de registo **N.15.061.UDER**, como utilizador de subprodutos animais de categoria 3 para fins de investigação.

Com os melhores cumprimentos,

**José M. Correia**

Eng. Téc. Agr.

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DCCA – Divisão de Controlo da Cadeia Alimentar

Quinta do Marquês, Av.ª República, 2780-155 Oeiras

Tef. Geral: 21 446 40 00 Tef. Secret. 21 446 40 61

Fax: 21 446 40 99 e-mail: [jmcorreia@dgav.pt](mailto:jmcorreia@dgav.pt)





## DECLARAÇÃO Monografia de Investigação

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação, integrada no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

25/05/2016

O Investigador

Carlos Miguel Silva Sousa Veiga

#### Anexo XIV – Parecer da Orientadora



#### PARECER

Na qualidade de Orientadora do Trabalho de Monografia de Mestrado Integrado desenvolvido pelo estudante Carlos Miguel Silva Sousa Veiga, com o título “Osso de Choco como Biomaterial na Medicina Dentária” informo que foi por mim conferido e apresento o meu parecer:

- O trabalho de investigação é oportuno, bem estruturado, metodologicamente adequado e bem desenvolvido.
- A dissertação cumpre todas as normas científicas e de apresentação escrita, apresenta o tema de forma clara, define corretamente os objetivos a que se propõe, apresenta uma introdução muito completa e os materiais e métodos minuciosamente descritos. A bibliografia está relacionada com o tema de investigação.
- O candidato tem programada uma submissão de uma publicação internacional.
- Assim, o candidato reúne condições para apresentar a monografia e submeter-se a provas públicas.

Porto, 23 de Maio de 2016

A Orientadora,